

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE CEPAS DE RIZOBIOS ASOCIADOS A CULTIVOS DE ARVEJA (*Pisum sativum* L.), CHOCHO (*Lupinus mutabilis* S.), FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.), HABA (*Vicia faba* L.) Y VICIA (*Vicia* sp.) EN SUELOS DE LA PROVINCIA DE IMBABURA Y OBTENCIÓN DE UN BANCO DE CEPAS.**

**María José Carpio<sup>1</sup>, Soraya Alvarado<sup>1</sup>, Betty Paucar<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP, Departamento de Manejo de Suelos y Aguas – DMSA, Estación Experimental Santa Catalina – EESC, Ecuador. E-mail: laboratorio.dmsa@iniap.gob.ec.

**RESUMEN**

Se aislaron cepas de rizobios a partir de nódulos de raíces de cinco plantas leguminosas, arveja (*Pisum sativum* L.), chocho (*Lupinus mutabilis* S.), fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), haba (*Vicia faba* L.) y vicia (*Vicia* sp.) de suelos de Imbabura, Ecuador. Además, cepas de rizobios del banco de rizobiología del INIAP, se reactivaron de su estado de liofilización, y otras se refrescaron de su estado de vejez; con el propósito de caracterizarlas morfológica y bioquímicamente, para identificar el género y formar un cepario de rizobios. Una vez aislados los rizobios de los nódulos, se sembraron y purificaron en medio de cultivo LMA+RC. Se realizaron cinco pruebas de autenticación, observándose bacilos cortos Gram negativos, con reacción ácida y una sola cepa con reacción alcalina. El análisis de conglomerados de la caracterización morfológica y bioquímica clasificó a las cepas de rizobios de cultivos de arveja en siete y once grupos, de chocho en seis grupos, de fréjol en seis y trece grupos, de haba en cinco y once grupos, y de vicia en cuatro y ocho grupos, respectivamente. Los resultados señalaron que los rizobios asociados a los cultivos de fréjol, arveja, haba y vicia pertenecen al género *Rhizobium*, los rizobios asociados a los cultivos de chocho pertenecen al género *Ochrobactrum* y uno al género *Bradyrhizobium*. Se identificaron catorce cepas de rizobios capaces de crecer mejor en ambientes hostiles, las cuales tienen un uso potencial como bioinoculantes. Esto afianza la posibilidad de establecer estudios que permitan evaluar en una etapa de invernadero y campo el potencial de fijación de nitrógeno de las cepas caracterizadas.

**Palabras clave:** leguminosas, nodulación, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*.

## ABSTRACT

Rhizobia strains were isolated from root nodules of five legumes plants, pea (*Pisum sativum* L.), lupine (*Lupinus mutabilis* S.), bean (*Phaseolus vulgaris* L.), broad bean (*Vicia faba* L.) and vetch (*Vicia* sp.) from Imbabura soils, Ecuador. Also, rhizobia strains belonging to INIAP rhizobiology bank, were reactivated from its lyophilization state and other strains were refreshed from its old age. Rhizobia were characterized morphologically and biochemically in order to identify the genera to stablish a rhizobia strain collection. Once rhizobia strains were isolated from the nodules, they were cultured and purified in YMA + CR. Five authentication tests were performed, short Gram negative bacilli were observed. It was observed acid reactions and a single strain with alkaline reaction. The morphological and biochemical characterization cluster analysis classified rhizobia strains from pea crops in seven and eleven clusters, from lupine crops in six clusters, from bean crops in six and thirteen clusters, from broad bean crops in five and eleven clusters and from vetch crops in four and eight clusters, respectively. The results indicated that rhizobia strains associated with pea, bean, broad bean and vetch crops belong to the *Rhizobium* genus. The rhizobia strains associated with lupine crops belong to the *Ochrobactrum* genus and one strain to *Bradyrhizobium* genus. Fourteen strains were identified as able to grow better in hostile environments; they have potential use as bioinoculants. This strengthens the possibility to establish studies that allow evaluating in a greenhouse and field stage the potential nitrogen fixation of the characterized strains.

**Key words:** legumes, nodulation, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*.

---

### Introducción

En el Ecuador, las leguminosas son componentes de los sistemas de producción, principalmente en la región Sierra (Bernal, 2006). Sin embargo, los rendimientos de estas plantas y de los

cultivos en general en el país son bajos, debido principalmente a factores bióticos (plagas y enfermedades), abióticos (erosión y suelos pobres en nutrientes, principalmente nitrógeno), y al mal manejo agronómico de los suelos (sistemas de labranza convencionales,

alto uso de agroquímicos). Todos estos factores han contribuido para acelerar la degradación de los suelos en esta región; y consecuentemente, para la pérdida considerable de fertilidad de los mismos (INIAP-DMSA, 1994; García y Correa, 2010; Bernal, 2012).

Para suplir la deficiencia de nitrógeno, incrementar los rendimientos de las leguminosas y mejorar la calidad de los suelos, a través de las prácticas de fertilización, existen dos maneras de hacerlo: 1) manejando apropiadamente el uso de fertilizantes, en especial los nitrogenados, y 2) aprovechando la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de las leguminosas al asociarse simbióticamente con las bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno “rizobios”, en los nódulos radiculares, en los que tiene lugar este proceso (Graham, 2004).

La fertilización química causa el deterioro del suelo y del agua. Además, la planta solo utiliza entre el 30 y el 50% del fertilizante nitrogenado aplicado (Danso y Eskew, s.f); costos elevados y requerimientos altos de energía para su elaboración limitan el uso en la producción agrícola tanto en la

Sierra como en la Costa Ecuatoriana (Bernal *et al.*, 2004; Bernal, 2012).

La fijación biológica de nitrógeno es considerada como una de las alternativas más viables para recuperar este elemento en los ecosistemas. Los rizobios son responsables del 80% de esta fijación (Graham, 2004). Las cantidades de nitrógeno atmosférico fijado por los rizobios son de gran importancia económica, posibilitando, por ende, la disminución del uso de fertilizantes sintéticos como la urea (Cayo y Rojas, 2006; Bernal, 2012).

Sin embargo, la cantidad de nitrógeno fijado por las leguminosas durante su período vegetativo está en función de la capacidad del rizobio para fijar nitrógeno, de la especie de leguminosa, y de las condiciones de suelo y clima. Por lo tanto, para una inoculación exitosa, hay que realizar una identificación y selección de cepas específicas, eficientes y de una alta competitividad con rizobios nativos para que sirvan como inoculantes en sitios donde se encuentren condiciones ambientales adversas (Brockwell & Bottomley, 1995).

El propósito de esta investigación consistió en aislar cepas nativas de rizobios a partir de nódulos recolectados de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia, en suelos de la provincia de Imbabura, para caracterizarlos morfológica y bioquímicamente, identificar los géneros rizobiales asociados a estas leguminosas, establecer las cepas capaces de crecer mejor en ambientes hostiles, y obtener un banco de cepas como fuente de bioinóculos en la fertilización de los suelos ecuatorianos.

## **Materiales y métodos**

### **Áreas de muestreo**

El muestreo de los nódulos de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia, se realizó en veintiún localidades pertenecientes a cinco parroquias de tres cantones (Antonio Ante, Cotacachi, Otavalo) de la provincia de Imbabura (figura 1, tabla 2).

### **Recolección de nódulos**

Para la toma de nódulos, se seleccionaron en el campo las mejores plantas en estado de floración. Se excavó con una pala hasta exponer las raíces de las leguminosas. Se

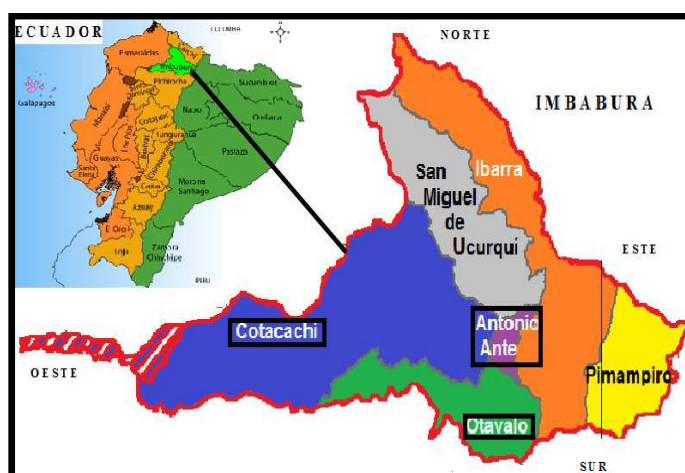
seleccionaron de diez a veinte nódulos vivos e intactos de la misma planta y se los recogió con 1 cm de raíz hacia los lados, se colocaron en tubos con sílica-gel y una capa de algodón, se taparon e identificaron, y se almacenaron en un termo a 4°C para su transporte al laboratorio (CIAT, 1988). Paralelamente a la recolección se recopiló información de la nodulación.

### **Hidratación y desinfección de nódulos**

Se colocaron los nódulos en agua destilada por 30 min para hidratarlos y lavarlos, luego se los sumergió en etanol (95%) durante 1 min para esterilizarlos superficialmente, después se los transfirió a una solución de hipoclorito de sodio (3%) durante 3 min, y finalmente se lavaron los nódulos por cinco veces en agua destilada estéril (CIAT, 1988).

### **Aislamiento de rizobios recolectados de Imbabura**

Previo al aislamiento de los rizobios, se preparó el medio levadura manitol agar (LMA), a pH 6.8, que contenía (g/L): 0.10 NaCl, 0.20 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.20 MgSO<sub>4</sub>, 0.40 extracto de levadura, 7.00 manitol, 20.00 agar; y se le añadió 10.00 mL del



**Figura 1.** Mapa de la provincia de Imbabura y cantones donde se realizó la recolección de nódulos para el aislamiento de las cepas de rizobios (<http://www.zonu.com/America-del-Sur/Ecuador/Imbabura/Politicos.html>).

**Tabla 1.** Cantones, parroquias y localidades donde se recolectaron los nódulos asociados a las cinco plantas leguminosas en suelos de Imbabura, con sus códigos y número de muestras.

Cantón	Parroquia	Localidad	Código	Nº de muestras por localidad	Nº de muestras por cantón
Cotacachi	El Sagrario	Tunibamba	TU	1	50
		Imantag	AG	2	
		Quitumba San Isidro	QSI	2	
		El Morlán	MO	4	
		Rabanal	RA	4	
		Quitumba Grande	QG	11	
		Peribuela	PE	26	
Antonio Ante	San Roque	Chamanal	CHA	1	18
		Pucará	PU	2	
		El Cerotal	CE	3	
		Hatun Rumi	HR	3	
		Santa Rosa	SR	4	
Otavalo	Miguel	San Agustín	SA	5	37
		Imbaquí	IM	2	
		Egas	PEG	2	
		Cabezas	QUI	7	
		Ilumán	CA	2	
		Rumilarca	RU	3	
		San Luis de Agualongo	SLA	5	
	San Juan de Ilumán	SJI	16		

indicador de contaminantes rojo congo (RC: 0.25 g/100 mL de agua destilada).

Se dividió al nódulo con un bisturí estéril y con un extremo del palillo se recogió las bacterias del interior para sembrarlas por estriado simple en el medio de cultivo. Las cajas se incubaron a 28°C hasta la obtención de colonias. Luego se procedió a purificarlas tres veces por agotamiento y multiplicarlas a partir de una colonia pura (CIAT, 1988).

### **Reactivación y refrescamiento de cepas del banco de rizobiología del INIAP**

Las cepas en estado de liofilización y en medio de cultivo consistieron en ocho ejemplares rizobianos aislados de suelos de Ecuador, y de suelos extranjeros (tabla 2).

Para la reactivación de las cepas, se colocó 1 mL de solución peptona estéril al 0.1% en cada tubo eppendorf conteniendo la cepa liofilizada y se lo agitó con ayuda de un vortex para homogenizar la suspensión. Se tomó 50 µL de la suspensión y se colocó en la superficie del medio LMA+RC. Se extendió la suspensión con un triángulo de vidrio esterilizado y se incubó la caja

a 28°C durante siete días. Se purificó por agotamiento una vez más a cada aislado bacteriano (CIAT, 1988).

Para el refrescamiento de las cepas, se preparó medio LMA+RC y se le añadió, una vez esterilizado, dos fungicidas, nistatina (0.05 g/L) y PCNB (0.1 g/L), por filtración. Luego se realizó el cultivo mediante estriado simple a partir de las bacterias (en estado de vejez) que se encontraban en cajas Petri con medio LMA. Se procedió a la purificación por agotamiento cinco veces más para cada aislado bacteriano, debido a la presencia de contaminación de hongos en las cajas originales (CIAT, 1988).

### **Pruebas de autenticación de rizobios**

#### **Cultivo en medio levadura manitol agar + azul de bromotimol**

Se preparó medio LMA, a pH 6.8, y se le añadió 5.00 mL del indicador azul de bromotimol (ABT: 0.50 g/100 mL de etanol). Para el caso de rizobios de crecimiento rápido, el medio acidifica (amarillo), mientras que para rizobios de crecimiento lento, el medio alcaliniza (azul), según el CIAT (1988).

**Tabla 2.** Sitio de referencia, origen, planta hospedera, código, género y especie de las cepas de rizobios asociadas a nódulos de plantas de arveja (*Pisum sativum* L.), chocho (*Lupinus mutabilis* S.), fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) y haba (*Vicia faba* L.) reactivadas y refrescadas del banco de rizobiología del INIAP.

Banco INIAP	Sitio de referencia /Origen	Planta hospedera	Nombre científico	Código de la cepa	Género y especie de la cepa
DMSA	Universidad de Minnesota	Fréjol	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	UMR 1278	<i>Rhizobium etli</i>
DMSA	Universidad de Minnesota (Ecuador -Lucero, Loja)	Fréjol	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	UMR 1481	<i>Rhizobium etli</i>
DMSA	Universidad de Minnesota (Ecuador -Indiucho, Loja)	Fréjol	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	UMR 1478	<i>Rhizobium etli</i>
DMSA	Universidad de Minnesota (Colombia)	Fréjol	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	UMR 1899	<i>Rhizobium tropici</i>
PRONALEG	-	Fréjol	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	FR 1511	-
PRONALEG	-	Fréjol	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	FR 1063	-
DMSA	(Ecuador -Ingapirca, Cañar)	Arveja	<i>Pisum sativum</i> L.	ECUA-I1	-
DMSA	-	Arveja	<i>Pisum sativum</i> L.	001-AR-EC	-
DMSA	-	Arveja	<i>Pisum sativum</i> L.	002-AR-EC	-
DMSA	-	Arveja	<i>Pisum sativum</i> L.	005-AR-EC	-
PRONALEG	Universidad de Minnesota	Arveja	<i>Pisum sativum</i> L.	UMR 6101	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>
PRONALEG	Universidad de Minnesota	Arveja	<i>Pisum sativum</i> L.	UMR 6005	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>
PRONALEG	NifTAL	Arveja	<i>Pisum sativum</i> L.	TAL 1236	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>
PRONALEG	-	Haba	<i>Vicia faba</i> L.	FB 481	-
PRONALEG	-	Haba	<i>Vicia faba</i> L.	HA-VIC-001	-
PRONALEG	-	Chocho	<i>Lupinus mutabilis</i> S.	C8 B	-

\*UMR: University of Minnesota *Rhizobium* collection code.

\*ECUA/EC: Ecuador

\*-: desconocido

### **Cultivo en medio levadura manitol agar + púrpura de bromocresol**

Se preparó el medio LMA, a pH 5.5, y se le añadió 5.00 mL del indicador púrpura de bromocresol (PBC: 0.50 g/100 mL de etanol). Para rizobios de crecimiento rápido, el medio acidifica tornándose amarillo, y para rizobios de crecimiento lento, el medio alcaliniza volviéndose púrpura (CIAT, 1988).

### **Cultivo en medio glucosa peptona agar + púrpura de bromocresol**

Se preparó el medio glucosa peptona agar (GPA), a pH 6.8, que contenía (g/L): 5.00 glucosa, 10.00 peptona, 20.00 agar; y se le añadió 10.00 mL del indicador PBC al 1%. En este medio los rizobios no se desarrollan bien, por tanto, un crecimiento notorio acompañado de un cambio de pH, es efecto de la presencia de un contaminante, descartándose que sean rizobios (CIAT, 1988).

### **Cultivo en medio levadura lactosa agar + reactivo de Benedict**

Se preparó el medio levadura lactosa agar (LLA), a pH 6.8 (misma fórmula que el medio LMA pero se reemplaza el manitol por la lactosa).

Luego se cubrieron las cajas con 15 mL de reactivo de Benedict para observar cambio o no de coloración. Si el color resultante es azul, se presume que el cultivo es rizobio; si el color es amarillo significa que el cultivo es *Agrobacterium*.

### **Tinción de Gram**

Se realizó la tinción de Gram para comprobar las características tintoriales de los rizobios, es decir, bacilos Gram negativos que retienen el rojo de la safranina (CIAT, 1988).

### **Conservación de las bacterias**

Se preparó una solución de peptona al 10% y otra de sacarosa al 20%. Se mezclaron y se dispensó en cajas Petri conteniendo la bacteria, se frotó la superficie del medio con un triángulo de vidrio estéril, hasta formar una suspensión bacteriana homogénea. Se colocó alícuotas de 200  $\mu$ L de la suspensión en tubos eppendorf previamente esterilizados. Los tubos se llevaron a un liofilizador y permanecieron 24 h a  $-54^{\circ}\text{C}$ , luego de lo cual se almacenaron en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  (CIAT, 1988; Jerez, 2004).



### **Caracterización morfológica**

Se determinó la morfología de las colonias según ocho características, cada una de ellas con sus particularidades: textura (elástica, cremosa, acuosa, gomosa), cantidad de goma (abundante, mediana, escasa, nula), apariencia (opaca, brillante, translúcida), tamaño (pequeño <2mm, mediano 2-5 mm, grande >5 mm), elevación (pulvinada, convexa, elevada, plana), margen (entero, ondulado, erosionado), forma (circular, fusiforme, irregular) y color (rosado intenso, rosado coral, rosado pálido).

### **Tiempo de crecimiento**

Se determinó dos rangos de crecimiento: tres días para rizobios de crecimiento rápido y siete días para rizobios de crecimiento lento (CIAT, 1988; Somasegaran & Hoben, 1994).

### **Crecimiento**

Se procedió a la multiplicación de las distintas cepas de bacterias en medio líquido levadura manitol (LM). Se incubó a 28°C en agitación continua por aproximadamente cuatro días, hasta que el caldo alcanzó una concentración de  $10^9$  cel/mL, que fue determinado por la

metodología de McFarland y por espectrofotometría (Somasegaran & Hoben, 1994; Bernal & Graham, 2001). Se llevó la muestra a una concentración final de  $10^5$  cel/mL por dilución en agua estéril, se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L y se depositó en las cajas bi-Petri conteniendo el medio de cultivo con la prueba bioquímica. Con un triángulo de vidrio estéril, se dispensó la suspensión bacteriana a través de toda la superficie del medio (Somasegaran & Hoben, 1994; Bernal & Graham, 2001).

### **Caracterización bioquímica**

Para evaluar el metabolismo de las cepas se utilizaron trece fuentes de carbono: sorbosa, citrato, tartrato, D-glucorónico, eritritol, dulcitol, lactato, glucosa, galactosa, xylosa, fructosa, maltosa y sacarosa, cada una usada en una concentración final de 1 g/L; y tres fuentes de nitrógeno: glicina, triptófano y tirosina, cada una usada en una concentración final de 0.5 g/L, en un medio basal que contenía (g/L): 0.01  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.10  $\text{CaCl}_2$ , 0.20  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.00  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.00  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.00  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20.00 agar.

Se probó la resistencia a cuatro antibióticos: estreptomicina (3 ug/mL), kanamicina (10ug/mL), ácido nalidíxico (40 ug/mL) y cloranfenicol (50 ug/mL); a cuatro metales pesados: aluminio (500 ug/mL), plomo (500 ug/mL), cobre (100 ug/mL) y zinc (100 ug/mL); a tres niveles de pH: 4.5, 5 y 8.5; y a tres concentraciones de NaCl: 0.5%; 1% y 2%, todos contenidos en medio triptona levadura agar (TLA), a pH 7, cuya fórmula es (g/L): 0.294 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1.00 extracto de levadura, 10.00 triptona, 20.00 agar.

Se evaluó también la resistencia a cuatro concentraciones de nitrógeno (a partir de urea): 20, 50, 100 y 500 µg/mL, en una dilución de 1 g/L, contenidos en medio LMA.

Finalmente, las placas se incubaron a 28°C y después de siete días se determinó la presencia o ausencia de crecimiento de los rizobios (Bernal & Graham, 2001).

Las fuentes de carbono y nitrógeno, así como los antibióticos y metales pesados se esterilizaron por filtración utilizando filtros Acrodisc de 0.2 µm, para ser añadidos a los distintos medios

estériles a 55°C (Bernal & Graham, 2001).

### **Identificación taxonómica**

Se realizó matrices de datos que se sometieron a un análisis de conglomerados, a partir de estas matrices se construyó un árbol filogenético en el programa estadístico NTSYS-pc, y mediante el método de agrupamiento UPGMA se generaron dendogramas que mostraron el parentesco y la relación fenotípica entre las cepas (Bernal & Graham, 2001).

### **Resultados**

Se observó que la nodulación de las raíces de arveja, fréjol, haba y vicia fue mediana y abundante, con nódulos ubicados en la raíz secundaria principalmente, de tamaño pequeño (<5mm) y grande (>5mm), con superficies lisas y rugosas, y formas alargadas e irregulares, y redondas (fréjol). La nodulación de las raíces de chocho fue escasa, con nódulos ubicados en la raíz primaria, de gran tamaño (>5mm), de formas irregulares (pleomórficas) y superficies rugosas.

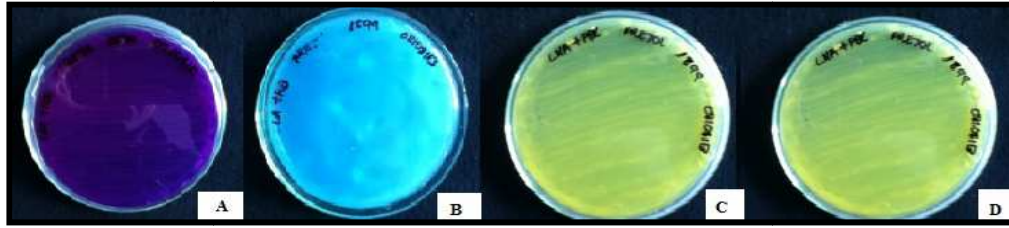
Se aislaron ciento cinco cepas de rizobios a partir de los nódulos recolectados, sin embargo, diecinueve muestras no fueron viables, debido a nódulos con rizobios inactivos y muertos, o problemas en el proceso de desinfección. Además, se reactivaron y refrescaron dieciséis cepas provenientes del banco del INIAP.

Las cepas de rizobios asociadas a los cinco cultivos de leguminosas, presentaron crecimiento rápido, con un tiempo promedio de aparición de tres días. La cepa C8 B de chocho, fue la excepción, ya que mostró un crecimiento lento, con un tiempo promedio de aparición de siete días.

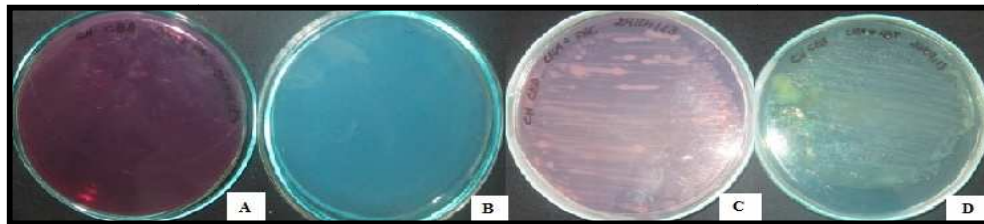
Se observó que para el caso de rizobios de crecimiento rápido, los medios LMA+ABT y LMA+PBC acidificaron, cambiando su color a amarillo (figuras 2, 4), mientras que para el caso del único rizobio de crecimiento lento (C8 B) los medios alcalinizaron, cambiando su color a azul y púrpura, respectivamente (figura 3). Estos resultados indicaron que se trataba posiblemente de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

La mayoría de rizobios no crecieron en el medio GPA+PBC, ni lo alteraron de color (figuras 2, 3), sugiriendo la presencia de rizobios. Sin embargo, las cepas FR 1063 de fréjol, FB 481 de haba y TAL 1236 de arveja, alteraron el pH del medio, volviéndolo color amarillo a los dos días de incubación, pero conforme pasó el tiempo (cinco días) el medio retornó al color púrpura original (figura 5). Las cepas R-FR-PE-2b de fréjol y R-HA-PE-3 de haba, presentaron crecimiento abundante y alteración del pH del medio, cambiando su color a amarillo, y demostrando que no eran rizobios (figura 6).

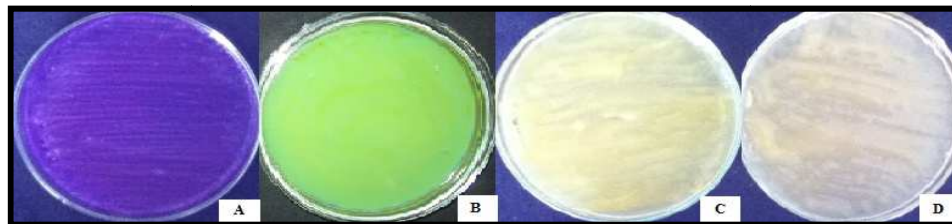
Se observó que la mayoría de rizobios no cambió la coloración del medio LLA al añadir el reactivo de Benedict, permaneciendo de color azul (figuras 2, 3). Estos resultados indicaron que se trataba de rizobios. No obstante, las cepas FR 1063 de fréjol, FB 481 de haba y TAL 1236 de arveja presentaron un cambio parcial de color (azul-verdoso) al añadir el reactivo pero no se tornó completamente a amarillo (figura 4); las cepas R-FR-PE-2b de fréjol y R-HA-PE-3 de haba, por lo contrario,



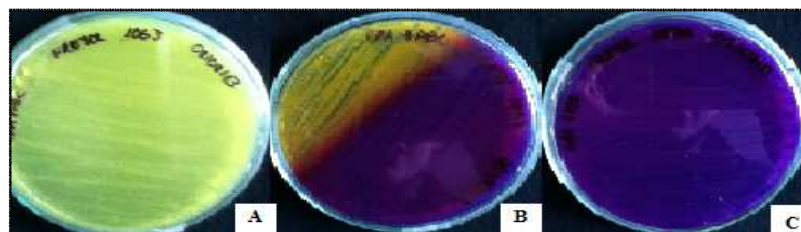
**Figura 2.** Pruebas de autenticación de la cepa UMR 1899 (*Rhizobium tropici*): A. GPA+PBC: ausencia de crecimiento (púrpura) B. LLA+RB: sin cambio de coloración (azul) C. LMA+PBC: reacción ácida (amarillo) D. LMA+ABT: reacción ácida (amarillo).



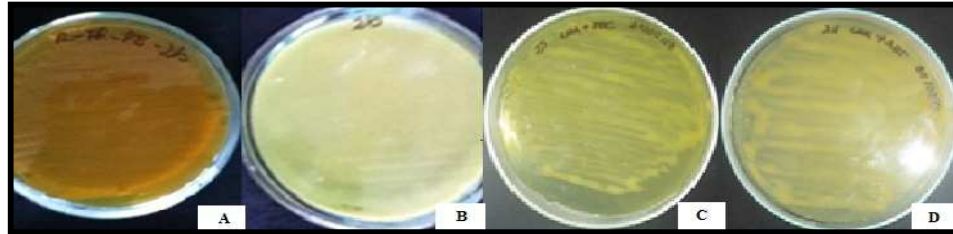
**Figura 3.** Pruebas de autenticación de la cepa C8 B. (*Bradyrhizobium* sp.): A. GPA+PBC: ausencia de crecimiento (púrpura) B. LLA+RB: sin cambio de coloración (azul) C. LMA+PBC: reacción alcalina (púrpura) D. LMA+ABT: reacción alcalina (azul).



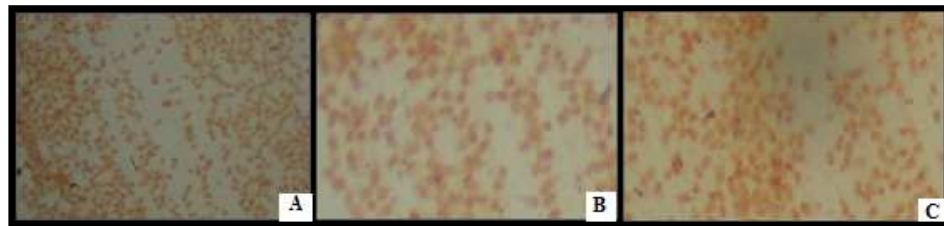
**Figura 4.** Pruebas de autenticación de la cepa TAL 1236 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*): A. GPA+PBC: ausencia de crecimiento (púrpura) B. LLA+RB: cambio parcial de coloración (azul-verdoso) C. LMA+PBC: reacción ácida (amarillo) D. LMA+ABT: reacción ácida (amarillo).



**Figura 5.** Pruebas de autenticación en medio GPA+PBC de la cepa FR 1063: A. acidificación del medio (amarillo) a los dos días de incubación B. retorno parcial a la coloración original del medio a los tres y cuatro días C. retorno total a la coloración del medio original a los cinco días.



**Figura 6.** Pruebas de autenticación de la cepa R-FR-PE-2b (*Agrobacterium*): A. GPA+PBC: presencia de crecimiento (amarillo) B. LLA+RB: cambio de coloración (amarillo) C. LMA+PBC: reacción ácida (amarillo) D. LMA+ABT: reacción ácida (amarillo).



**Figura 7.** Tinción de Gram de cepas de rizobios vistas al microscopio en 100x: bacilos Gram negativos cortos no esporulados A. cepa UMR 1899 (*Rhizobium tropici*) B. cepa UMR 1278 (*Rhizobium etli*) C. cepa TAL 1236 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*).

mostraron cambio de coloración de azul a color amarillo, confirmando la presencia de *Agrobacterium* en ambas muestras (figura 6).

Se observó al microscopio (100x) bacilos Gram negativos cortos móviles no esporulados (figura 7).

Los cien aislamientos autenticados como rizobios fueron liofilizados, y se mantienen almacenados en el laboratorio de Microbiología del DMSA

a 4°C en refrigeración, formando el banco de rizobios.

Se obtuvieron diez dendogramas de la unificación de los resultados de las características morfológicas y bioquímicas realizadas a las cepas de rizobios asociadas a las cinco plantas leguminosas en estudio, con el objeto de observar la relación fenotípica de los aislamientos. Para el análisis de conglomerados, se definieron grupos con características similares en más del 85%. Según la morfología, se formaron

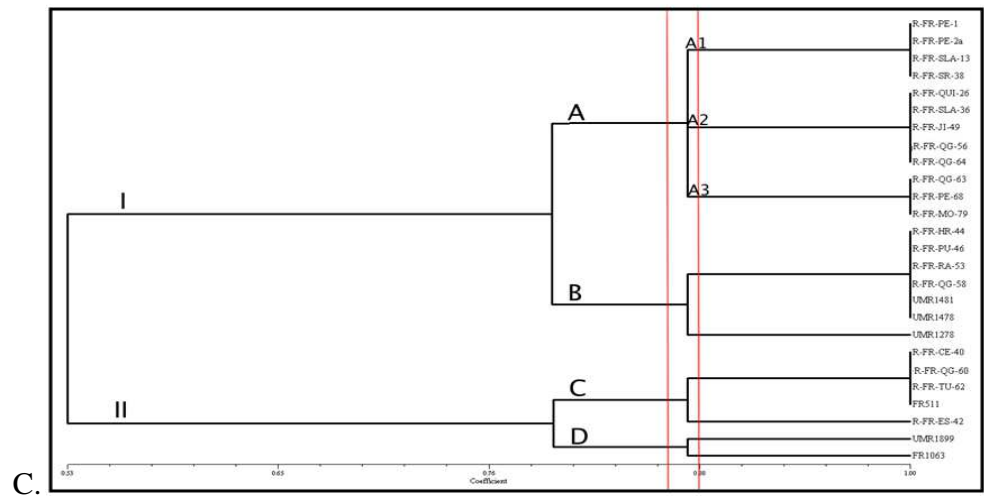
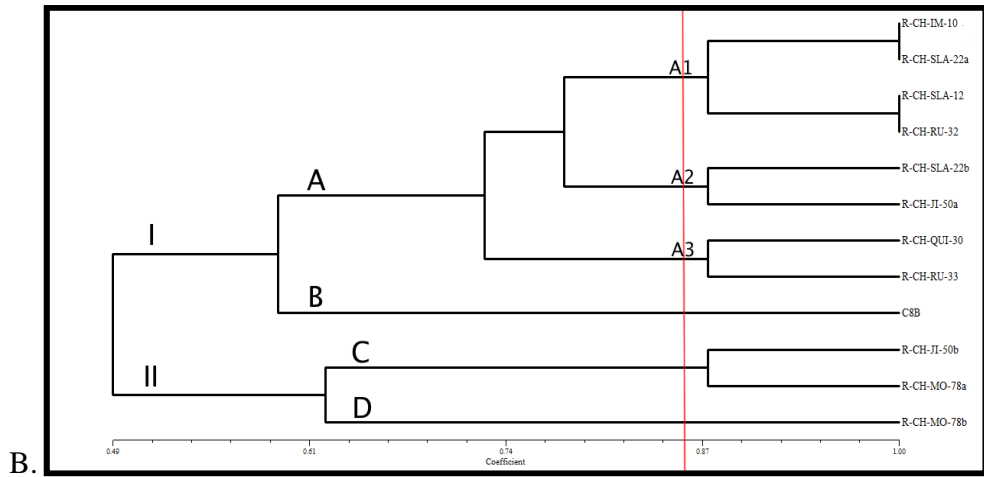
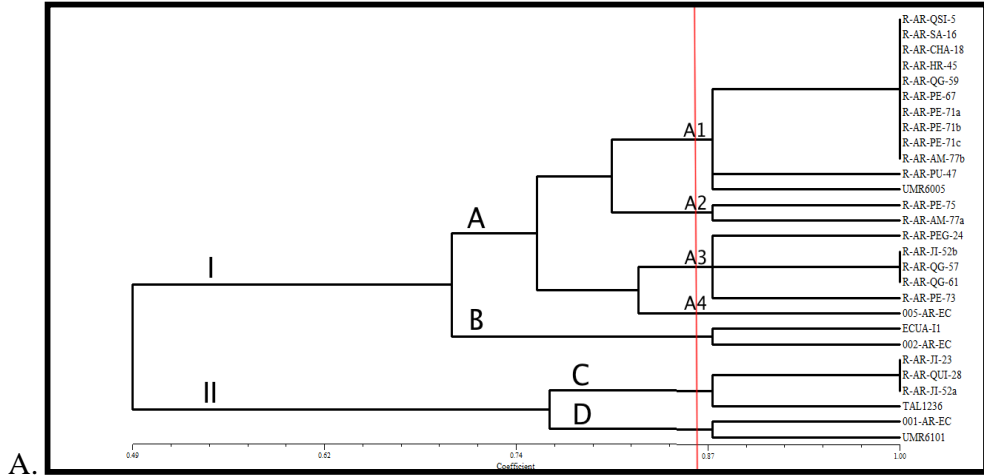
siete grupos de rizobios de arveja, seis de chocho, seis de fréjol, cinco de haba, y cuatro de vicia (figura 8). Estos resultados señalaron que las cepas de arveja, fréjol, haba y vicia, pertenecen al género *Rhizobium*, mientras que la caracterización morfológica de los rizobios de chocho, indicó que pertenecen al género *Ochrobactrum*, y una cepa (C8 B) al género *Bradyrhizobium*.

Según la bioquímica, se formaron once grupos de rizobios de arveja, seis de chocho, trece de fréjol, once de haba, y ocho de vicia (figura 9). Estos resultados indicaron que las cepas de rizobios, provenientes del banco del INIAP, poseen amplios límites de tolerancia a condiciones de estrés (pH ácidos y alcalinos, salinidad, metales pesados, urea, antibióticos) y gran capacidad de metabolizar diversas fuentes nutricionales. Así mismo, cabe destacar que las cepas de chocho fueron los aislamientos más resistentes a las

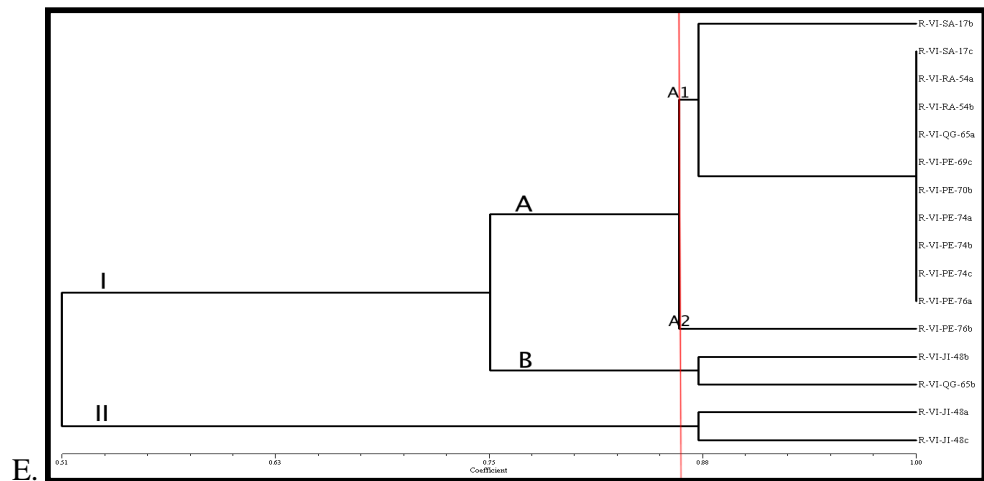
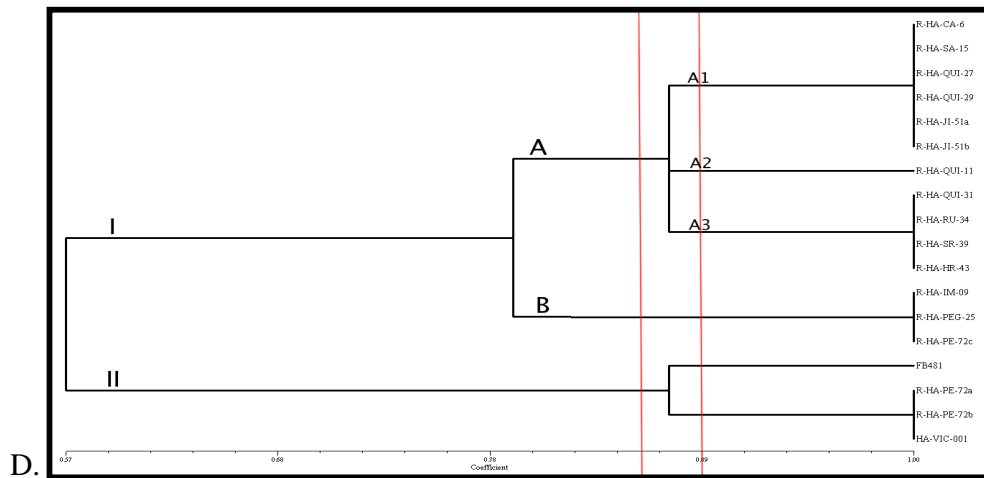
condiciones de estrés de los cinco cultivos de leguminosas, excepto por la cepa de crecimiento lento C8 B, la cual fue muy sensible. Los rizobios de arveja, fréjol, haba y vicia recolectados de la provincia de Imbabura mostraron una resistencia moderada a las condiciones hostiles.

### **Discusión**

Dentro de los cultivos de arveja, fréjol, haba y vicia se encontraron cepas con características del género *Rhizobium*. El CIAT (1988) y Kuykendall *et al.* (2005), afirman que en las especies de este género, usualmente las colonias son redondas, lisas, con elevación convexa, elevada, a veces plana, con textura elástica, cremosa o acuosa, tienen una apariencia opaca, semitranslúcida o translúcida (dependiendo de la cantidad de lipopolisacáridos que produzca la cepa, según Spaink *et al.*, 1998), permanecen blancas o rosadas, producen goma, y el tamaño de la colonia varía de 2-5 mm.



**Figura 8.** Dendrogramas de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización morfológica realizada a las cepas de rizobios de: A. arveja (*Pisum sativum* L.) B. chocho (*Lupinus mutabilis* S.) C. fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.)



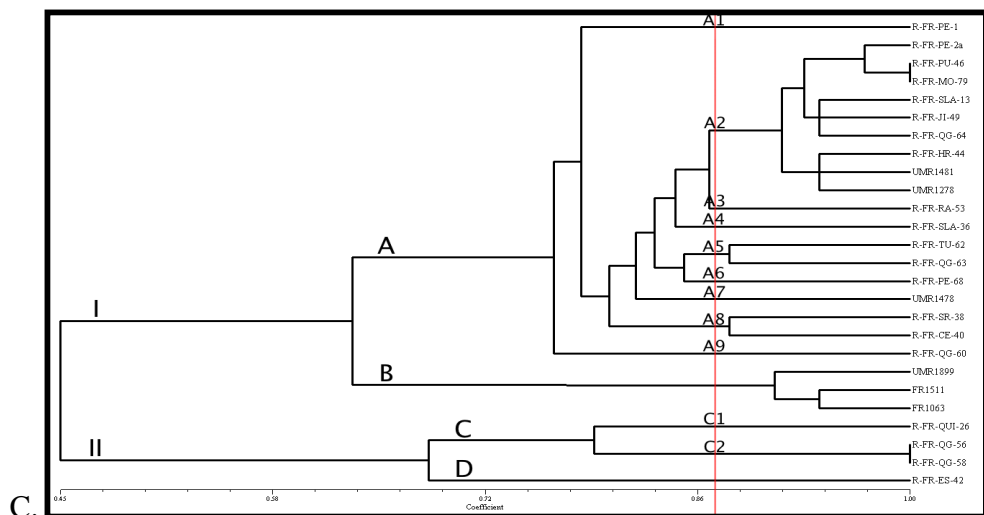
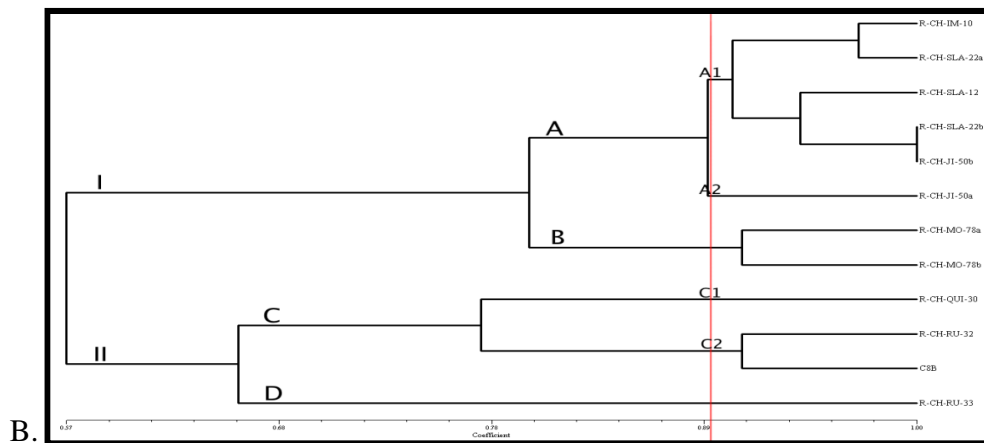
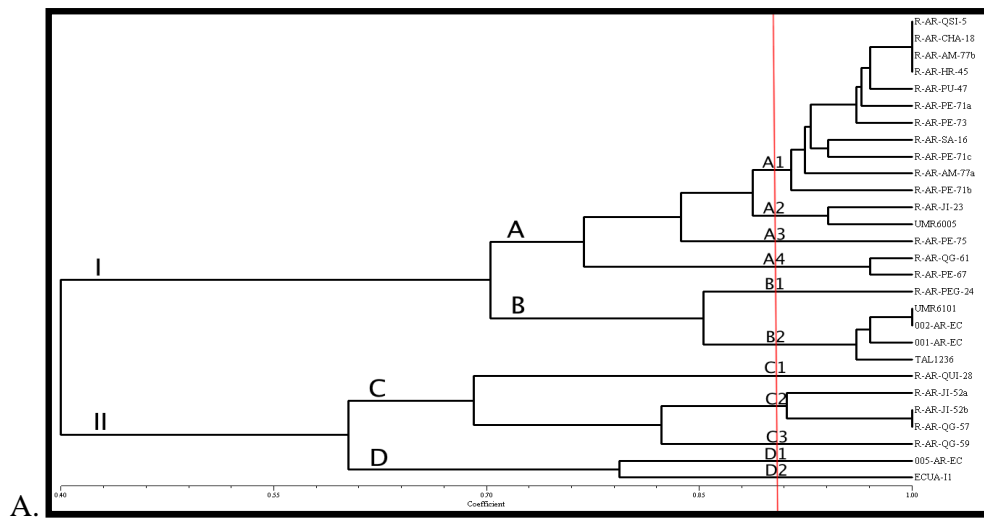
**Figura 8.** Dendogramas de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización morfológica realizada a las cepas de rizobios de: D. haba (*Vicia faba* L.) E. vicia (*Vicia* sp.).

entre los tres y cinco días de incubación; características que coincidieron con las observadas en la morfología de las colonias de los rizobios caracterizados en esta investigación.

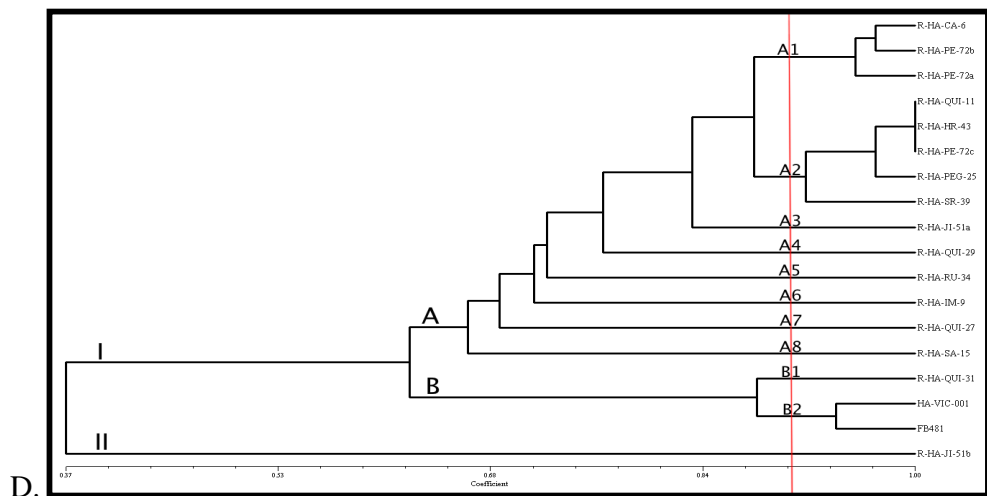
En los rizobios de los cultivos de chocho se encontraron cepas con

características del género *Ochrobactrum* y una cepa (C8 B) con características del género *Bradyrhizobium*. Se descartó *Rhizobium* ya que no se ha descrito nodulación por parte de este género en *Lupinus* (Sucojaya *et al.*, 1998, Trujillo *et al.*, 2005). Martínez (2007), citado por Moreno (2010), describe a las

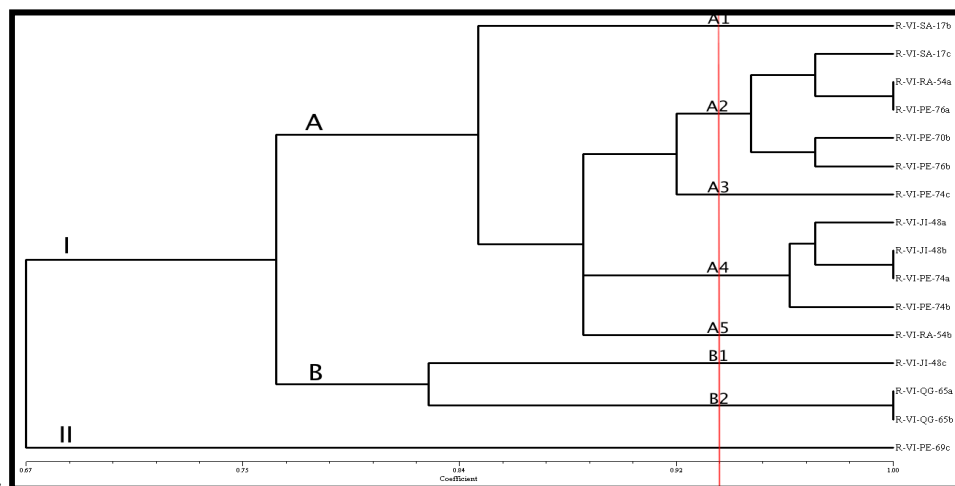




**Figura 9.** Dendrogramas de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización bioquímica realizada a las cepas de rizobios de: A. arveja (*Pisum sativum* L.) B. chocho (*Lupinus mutabilis* S.) C. fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.)



D.



E.

**Figura 9.** Dendogramas de agrupamiento por similitud en los resultados de la caracterización bioquímica realizada a las cepas de rizobios de: D. haba (*Vicia faba* L.) E. vicia (*Vicia* sp.).

especies de *Bradyrhizobium*, por lo general secas, opacas, y gomosas, raramente translúcidas, con forma circular, elevación convexa o pulvinada, con tendencia a tener textura granulosa, y el tamaño de las colonias de 1 mm a los siete días de incubación; características que coincidieron con las observadas en la morfología de la cepa

C8 B. Por otra parte, Trujillo *et al.* (2005), observaron que las especies del género *Ochrobactrum*, son mucoides, con bordes enteros y un diámetro promedio de 2-3 mm a los tres días de incubación.

La caracterización bioquímica de los aislamientos permitió revelar que

desde el punto de vista de las capacidades metabólicas y de resistencia a condiciones adversas de crecimiento, existe cierta heterogeneidad en las poblaciones de rizobios nodulantes de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia. Al respecto, Buendía-Clavería *et al.* (1991) indican que estas propiedades servirían para seleccionar cepas y de aquí manipular genes simbióticos. Matos-Cuzcano y Zuñiga-Dávila (2002), aseguran que las cepas que no ofrecen resultados en experimentos de laboratorio resultarían inadecuadas en el campo, por lo que es muy importante realizar ensayos de selección previos a su liberación como inoculantes.

Las cepas de rizobios aisladas de los suelos de Imbabura, en general, presentaron una baja tolerancia a cambios radicales de pH del medio (4.5 y 8.5), a altas concentraciones de sales (1% y 2%), a un metal pesado (zinc), a dos antibióticos (kanamicina, cloranfenicol) y una restringida utilización a una fuente de energía (citrato) y una de nitrógeno (glicina), lo que sugiere que el comportamiento de las poblaciones microbianas de rizobios presentes en los suelos de la provincia

de Imbabura podrían estar siendo influenciadas por los factores bióticos y abióticos donde se encuentran estas bacterias (Romero-Rojas, 2009).

Los resultados de este estudio concuerdan con algunas investigaciones realizados en regiones tropicales por varios autores (Contreras-Solar *et al.*, 2007, Cuadrado *et al.*, 2009, Marquina *et al.*, 2011), en el sentido de hallar una diversidad de especies rizobianas formadoras de nódulos en varias leguminosas, presentes en diferentes localidades. Lafay & Burdon (2007) han indicado que los trópicos constituyen un importante reservorio de genes de fijación de nitrógeno.

Finalmente, se aislaron cepas que mostraron capacidad de crecimiento en condiciones que se consideran adversas y que plantean una mayor flexibilidad fisiológica y capacidad de adaptación a las condiciones ambientales. Pueden ser consideradas para su evaluación en ensayos de invernadero y campo, que permitan confirmar las respuestas obtenidas en laboratorio; lo cual las hace buenas candidatas para el diseño y elaboración de biofertilizantes que respondan a las características

ambientales y de cultivo de las localidades en estudio en la provincia de Imbabura y demás provincias. El resto de las cepas no debe ser descartado, ya que Hernández-Flores (2011) asegura que con el seguimiento adecuado pueden llegar, igualmente, a ser útiles en el diseño de inoculantes.

### **Conclusiones**

Las cepas de rizobios aisladas de nódulos de arveja, fréjol, haba y vicia de la provincia de Imbabura, pertenecen al género *Rhizobium*.

Las cepas de rizobios aisladas de nódulos de chocho de la provincia de Imbabura, pertenecen al género *Ochrobactrum*.

Las cepas de rizobios 001-AR-EC, 002-AR-EC, 005-AR-EC, ECUA-II, FR 1511, FR 1063, HA-VIC-001 y FB 481 del banco de rizobiología del INIAP, pertenecen al género *Rhizobium*.

La cepa de rizobio C8 B del banco de rizobiología del INIAP, pertenece al género *Bradyrhizobium*.

Las plantas de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia, establecen simbiosis con rizobios de crecimiento rápido en los suelos de la provincia de Imbabura.

La planta de chocho es una leguminosa que se asocia con rizobios de crecimiento rápido y de crecimiento lento.

Las cepas de rizobios de crecimiento rápido exhibieron mejores cualidades de tolerancia a factores estresantes que la cepa de crecimiento lento C8 B.

Las cepas de rizobios asociadas a los nódulos de arveja R-AR-PEG-24, UMR 6101, 001-AR-EC, 002-AR-EC y TAL 1236, de chocho R-CH-MO-78b, de fréjol R-FR-QG-60, UMR 1899, FR 1511 y FR 1063, de haba R-HA-QUI-31, HA-VIC-001 y FB 481, y de vicia R-VI-SA-17b, son las más resistentes a las condiciones de estrés, y las que más asimilan las fuentes de carbono y nitrógeno ensayadas.

Las pruebas de crecimiento en diversas fuentes de carbono y nitrógeno, y de tolerancia a diferentes condiciones

de estrés de pH, NaCl, antibióticos, metales pesados y urea, son útiles para esbozar la diversidad genética de los rizobios y estudiar su papel ecológico e interacción con el ecosistema; sin embargo, no son concluyentes para identificar géneros y especies de estas bacterias.

El análisis de conglomerados de la caracterización morfológica indica la formación de siete grupos de cepas de rizobios asociadas a arveja, seis a chocho, seis a fréjol, cinco a haba, y cuatro a vicia, lo cual expresa variabilidad morfológica entre las cepas aisladas.

El análisis de conglomerados de la caracterización bioquímica indica la formación de once grupos de cepas de rizobios asociadas a arveja, seis a chocho, trece a fréjol, once a haba, y ocho a vicia, lo cual expresa variabilidad metabólica entre las cepas aisladas.

Existe alta diversidad morfológica y bioquímica de los rizobios recolectados de suelos de la provincia de Imbabura, con características particulares de gran

interés para el desarrollo de prácticas agrícolas en esta región.

El banco germoplásmico de microsimbiontes nodulantes de arveja, chocho, fréjol, haba y vicia, servirá como una colección de referencia para posteriores investigaciones en asociación con su hospedero.

### **Recomendaciones**

Caracterizar molecularmente las cepas para identificar a nivel de especie a los rizobios nativos de la provincia de Imbabura.

Estudiar los suelos de las localidades donde se recolectaron los nódulos, con el fin de evaluar si la capacidad de resistencia de las cepas nativas a las condiciones de estrés y la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno se relaciona directamente con un tipo de adaptación.

Evaluar a nivel de invernadero y campo el potencial fijador de nitrógeno de las cepas caracterizadas y su efecto en la promoción del crecimiento de las plantas.

Desarrollar pruebas de biofertilización con los rizobios más resistentes a las condiciones de estrés como alternativa para mejorar las condiciones físico-químicas de los suelos de Imbabura, en beneficio de la productividad agrícola de la provincia y demás regiones con características edafoclimáticas similares.

Llevar a cabo un estudio que permita identificar al mejor sustrato como portador de la bacteria, para fines prácticos, en el sentido de producir inoculantes.

Recolectar nódulos de las leguminosas estudiadas en otras regiones del país, complementando conocimientos adquiridos con la investigación realizada acerca de la biodiversidad de los rizobios en Ecuador.

Sincronizar la fecha de recolección de los nódulos con la época de crecimiento vegetativo de las leguminosas cuando haya adecuada disponibilidad de agua en el suelo, ya que en ese período los nódulos son más abundantes y activos.

## **Bibliografía**

- Bernal, G. & Graham, P. (2001). Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparissons with Mexican bean rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology*. 47(6): 526-534.
- Bernal, G., Suárez, A., Campaña, D., Jerez, M., Salvador, C., Graham, P. y Aguilar, M. (2004). Selección de cepas de *Rhizobium* adaptadas a condiciones de campo, y su uso como inoculantes de leguminosas de la Sierra y Costa Ecuatoriana. Ed. G Bernal. Quito, EC. pp. 80.
- Bernal, G. (2006). La fijación biológica del nitrógeno: componente clave de la fertilidad de los suelos y el rendimiento de cultivos en Ecuador. 1 ed. Fundación GAIA/INIAP. Quito, EC. pp. 145.
- Bernal, G. (2012). Selección de cepas de *Rhizobium* asociadas a leguminosas en el Ecuador: Casos INIAP y ANCUPA. IX

- Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Cuenca, EC. pp. 9.
- Brockwell, J. & Bottomley, P. (1995). Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biology and Biochemistry*. 27(4/5): 683-697.
- Buendía-Clavería A.M., Moussaid, A., Gil-Serrano A.M., Moreno J. Ollero, F. y Ruiz-Sainz, J.E. (1991). Efecto pleiotrópico de una mutación en el plásmido simbiótico de *Sinorhizobium fredii* HH103E. En: Perspectivas de la Fijación Biológica del Nitrógeno en el Umbral del siglo XXI. (1998). Eds. C. Arrese, M. Royuela, P.M. Aparicio-Tejo. Universidad Pública de Navarra, ES. pp. 106-110.
- Cayo, P. y Rojas, F. (2006). Efecto de la inoculación de dos cepas de *Rhizobium* sp. en relación a la nodulación del cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) abonado con humus de lombriz en la zona media del valle de Ica. Tesis Ing. Agr. Ica. PE. Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Facultad de Ciencias Agropecuarias. pp. 91.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO). (1988). Simbiosis leguminosa-rizobio: manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Ed. rev. Proyecto CIAT-UNDP. Sección de Microbiología de Suelos del Programa de Pastos Tropicales y del Programa de Frijol (comps.). pp. 178.
- Contreras-Solar, C.X., Iriarte-Martínez, J.L. y Muñoz-Acosta, A.P. (2007). Aislamiento y caracterización bioquímica, fisiológica y morfológica de géneros *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. asociados a la leguminosa *Cajanus cajan* en parcelas agrícolas del municipio de Sampués, Departamento de Sucre. Tesis Biol. Sincelejo, CO. Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología con énfasis en Biotecnología. pp. 153.

- Cuadrado, B., Rubio, G. y Santos, W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 38(1): 78-104.
- Danso, S.K. y Eskew, D.L. (s.f.). Aumento de la capacidad de fijación biológica del nitrógeno (en línea). *Agricultura y Alimentación*. OIEA Boletín. 26(2): 29-33. Extraído el 30 de agosto, 2013, de: [http://www.iaea.org/Publications/Magazines/Bulletin/Bull262/Spanish/26206882933\\_es.pdf](http://www.iaea.org/Publications/Magazines/Bulletin/Bull262/Spanish/26206882933_es.pdf)
- García, A. y Correa, D. (2010). Uso de indicadores de calidad del suelo como estrategia para prevenir su degradación. Publicado en *Memorias del XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo*. Santo Domingo, EC. 1 disco compacto, 8 mm (CD-Rom).
- Graham, P. (2004). *Rhizobium* Research Laboratory (RRL) (en línea). University of Minnesota, US. Extraído el 8 de septiembre, 2012, de: <http://www.rhizobium.umn.edu/research/publications.php>.
- Hernández-Flores, L. (2011). Aislamiento y evaluación del potencial biofertilizante de bacterias aplicables en el desarrollo agrícola sostenible en Chihuahua. Tesis Doctoral. Puebla, ME. Colegio de Postgraduados. Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas. pp. 171.
- INIAP-DMSA (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). (1994). Informe Anual del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas (DMSA). Ed. J Córdova. Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP). pp. 65.
- Jerez, M. (2004). Evaluación de Biotipos de *Bradyrhizobium* spp. en el cultivo del maní (*Arachis hypogaea* L.) en las provincias



- de Manabí y Loja. Tesis Ing. Agr. Quito, EC. UCE, Facultad de Ciencias Agrícolas. pp. 127.
- Kuykendall, D., Young, J., Martínez, E., Kerr, A. & Sawada, H. (2005). *Rhizobium*. (Frank 1889). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, USA. pp. 325-340.
- Lafay, B. & Burdon, J.J. (2007). Molecular Diversity of Legume Root-Nodule Bacteria in Kakadu National Park, Northern Territory, Australia. PLOS ONE. 2(3): e277.
- Marquina, M., González, N. y Castro, Y. (2011). Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. Revista de Biología Tropical. 59(3): 1017-1036.
- Matos-Cuzcano, G. y Zuñiga-Dávila, D. (2002). Comportamiento de cepas nativas de rizobios aisladas de la Costa del Perú en dos cultivares de Pallar (*Phaseolus lunatus* L.). Ecología Aplicada. 1(1): 19-24.
- Moreno, L. (2010). Caracterización de las cepas ICA L9 e ICA J196, de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno y pruebas de estabilidad de inoculantes elaborados para cultivos de arveja y soya. Tesis Máster. Bogotá, CO. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. pp. 143.
- Romero-Rojas, G.D. (2009). Caracterización y evaluación de la efectividad de la fijación de nitrógeno de cepas de "*Rhizobium*", asociadas a pueraria (*Pueraria phaseoloides* (roxb) benth), como cultivo cobertura de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* jacq). Tesis. Ing. Agrop. Quito, EC. ESPE, IASA II. pp. 112.
- Somasegaran, P. & Hoben, H.J. (1994). Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. Springer Laboratory. New York, USA. pp. 450.

Spaink, H., Kondorosi, A. & Hooykaas, P. (1998). The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer Academia Publishers. Norwell, US. pp. 566.

Sucojayo, L., Espinoza, G. y Chincheros, J. (1998). Determinación de la capacidad infectiva de cepas de *Bradyrhizobium lupini* resistentes a estreptomicina en plantas de Tarwi (*Lupinus mutabilis* y *Lupinus albus*) mediante pruebas de autenticación en solitario. Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. 6: 49-55.

Trujillo, M.A, Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A.M., Rivas, R., Ludena, D., Mateos, P.F., Martínez Molina, E. & Velazquez, E. (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Applied and Environmental Microbiology. 71(3): 1318-1327.